

## 審査の結果の要旨

氏名 豊島 美菜子

がんの転移・再発は固形がんの患者が死に至る主な原因であり、その克服は癌治療において最も難しい問題である。癌が転移するためには、播腫性、リンパ行性、血行性などの主要ルートがあるが、リンパ節以外の遠隔の臓器に転移する場合は血行性転移が重要であると考えられている。血行性転移において癌細胞は、原発巣における増殖、血管新生、周辺結合組織への浸潤、血管内への侵入、特定器官内での血管内皮細胞や血小板との接着、再び基底膜を貫通して血管外への脱出と浸潤、血管形成を含む微小環境の確立、そして増殖というプロセスを経ることが、癌転移の多方面からの研究より明らかにされてきた。

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは、様々な組織の細胞表面や細胞外基質、とくに基底膜の重要な構成成分であるが、このヘパラン硫酸プロテオグリカンを分解する酵素として、ヘパラーゼが知られている。ヘパラーゼは上記に示した癌転移のプロセスのうち主に、細胞の増殖、分化、運動の制御に関与しているとされており、高転移性細胞や、転移巣のある患者の血液中で高い活性が検出されている。しかしながら、これまで、この酵素の遺伝子はクローニングされておらず、その性質や生理的機能が十分に解明されていなかったため、ヘパラーゼを標的分子とした治療薬の開発のハードルとなっていた。そこで、本研究では、細胞外マトリックスの構成成分であるヘパラン硫酸に着目して、この巨大分子を分解するヒトヘパラーゼを精製し、cDNA をクローニングして、その酵素学的性質を調べた。さらに、癌細胞にヒトヘパラーゼを強制発現させて癌病態との関わりを研究し、転移性癌の診断治療の標的分子としての可能性を考察した。

### 1. ヒトヘパラーゼの精製、cDNA およびゲノムクローニング

ヒト繊維芽細胞 WI38/VA13 よりヒトヘパラーゼの精製、クローニングを行った。4種類のクロマトグラフィーの手法を用いて精製した結果、ヘパラーゼは約 50 kDa の糖たんぱくであることが判明された。そのアミノ酸配列より cDNA をクローニングしたところ、大きさ約 3.7 kb の *HSPE 1a* と約 1.8 kb の *HSPE 1b* の 2 つの splice variants が得られた。クローニングされた cDNA を導入した細胞はヘパラーゼ活性を発現したことから、この遺伝子は確かにヘパラーゼをコードしていることが明らかになった。さらに、ゲノムク

ローニングによりヘパラーゼ遺伝子は 14 の exon からなり、染色体座は 4q22 であることが判明した。

## 2. ヒトヘパラーゼ酵素とリコンビナント酵素の生化学的性質と基質特異性

ヘパラン硫酸は N-グルコサミン(GlcN)とウロン酸(グルクロン酸 GlcA/イズロン酸 IdoA)が $\beta(1-4)$ 結合する繰り返し 2 糖の基本構造を有している。基本の繰り返し構造は単純だが、生合成途上で硫酸化など様々な修飾を受け、ヘパラン硫酸は多様な分子量、分子構造となり、不均一性を有している。このような不均一な分子をヘパラーゼはどのような性質をもって分解するのかを検討した。まず、生化学的性質のうち精製酵素の至適 pH を調べたところ、4.2 であることが判明した。ヘパラーゼは、細胞外の炎症部位などの局所的な酸性条件下、若しくは細胞内でリソソームに運ばれたヘパラン硫酸が分解される際に働いていると考えられた。次に、バキュロウィルスによる発現系を用いてリコンビナントたんぱく質の発現、精製を行った結果、発現されたたんぱく質はプロセスされずに 543 aa の大きさを持ち、分子量は 65 kDa で、等電点は pI 7.4-9 であった。このリコンビナントヒトヘパラーゼを用いて基質特異性を検討したところ、リコンビナントヒトヘパラーゼが切るヘパラン硫酸/ヘパリン特異的な配列は、GlcN-GlcA-GlcN(NS,6S)で、GlcA の還元末端側を切断し、6 糖の長さがあることが望ましいことが明らかとなった。

## 3. ヒトヘパラーゼ導入細胞の細胞学的性質及び転移性

ヘパラーゼの cDNA をヒトメラノーマ細胞 A375M に導入し、発現させて、細胞の性質がどのように変化するかを調べた。まず、ヘパラーゼ導入メラノーマ細胞は、コントロール及びベクターのみ導入した細胞に比べて有意に浸潤能が高まっていた。そこで、浸潤能の高まった理由として、接着能と基底膜分解能の変化が考えられたので、これらの違いを調べた。接着能は、いずれの基質でも有意な差は認められなかったものの、基底膜分解能をヒト臍体上皮膜細胞が生合成した基底膜を用いて調べたところ、48 時間後には 2 倍以上の分解能の向上がみられた。癌細胞が高いヘパラーゼ活性を有することによって、基底膜のコラーゲンと非コラーゲン蛋白の結合に介在してマトリックスを構成・保護しているヘパラン硫酸を分解し、タイプ IV コラーゲンマトリックスを破壊して、血管外や周辺組織への浸潤を容易にすることが可能になると推察している。最後に実際にヘパラーゼ活性を付加された癌細胞の転移能を調べるために、A375M 細胞、ベクターのみ導入細胞、そしてヘパラーゼ導入メラノーマ細胞をヌードマウスの尾静脈から移植し、肺への実験的転移能をみた。5 x 10<sup>5</sup> 個の細胞を尾静脈より移植して 42 日後に剖検し、肺にあ

る結節の数を実体顕微鏡下で数えた結果、ヘパラーゼ導入細胞は約 10 倍に結節数が増えていた。つまり、ヘパラーゼ遺伝子を導入することにより、癌細胞の転移性が有意に高まることが明らかになった。

以上、本研究は、ヒトヘパラーゼを精製し、ヒトヘパラーゼ遺伝子をクローニングして、その酵素学的性質を調べ、さらに癌細胞に強制発現させることにより癌細胞の転移能が高まることを示したものであり、ヘパラーゼが転移の診断や治療の標的分子として重要であることが改めて明らかにされた。この成果は薬学、特に生命薬学における興味ある知見を明らかにしたものであり、博士(薬学)の学位を受けるに充分値するものと判断した。